



УДК 574.5; 574.2; 574.24

Оценка активности механизма множественной резистентности пресноводных амфипод к ксенобиотикам по интенсивности выведения родамина С

М. А. Тимофеев, Ж. М. Шатилина, В. В. Павличенко, Д. С. Бедулина,
М. В. Протопопова, Д. В. Аксенов-Грибанов, Е. А. Сапожникова

*Байкальский исследовательский центр, Научно-исследовательский институт биологии
при Иркутском государственном университете, Иркутск*

E-mail: m.a.timofeyev@gmail.com

Аннотация. Целью работы являлась оценка возможности использования флуорометрического метода для определения активности механизма множественной резистентности к ксенобиотикам у байкальских организмов на примере эндемичного вида амфипод *Eulimnogammarus cyaneus* (Dyb.). Оценивали активность механизма множественной резистентности в контрольных условиях и при интоксикации солями кадмия. Показано, что у исследованных амфипод при попадании в организм флуоресцентного препарата активировался механизм множественной резистентности к ксенобиотикам. Интоксикация рачков хлоридом кадмия вела к ингибированию данного процесса. Сделан вывод, что приведенный метод оценки активности механизма множественной резистентности при определенных условиях может применяться в экотоксикологических работах.

Ключевые слова: механизм множественной резистентности (MXR), амфиподы, Байкал, соли кадмия, родамин С.

Введение

Для большинства организмов характерны реакции множественной резистентности к ксенобиотикам [7]. В основе данного неспецифического процесса, известного также под названием MXR (MultiXenobiotic Resistance), лежит активность АВС-транспортёров – транспортных белков, функционирующих за счет энергии АТФ (АТР-binding cassette (ABC) transporters) [7]. Важнейшим белком семейства АВС-транспортёров является Р-гликопротеин. Как следует из большого списка опубликованных работ, Р-гликопротеин, являясь мембранным белком-переносчиком с широкой специфичностью, выводит из клеток обширный спектр ксенобиотиков [2; 7; 17]. Выводящая активность Р-гликопротеина часто принимается в качестве основного показателя активности всей системы множественной резистентности клетки или организма [1; 2; 9].

В последнее время механизмы, лежащие в основе множественной резистентности к ксенобиотикам, привлекают внимание токсикологов. Особенно актуально данное направление для гидробиологических исследований. Так, в ряде работ [6; 7] обсуждаются перспективы использования активности механизма MXR для

оценки неблагоприятных изменений внешних условий среды. Рассматривается возможность применения показателя активности механизма MXR у водных организмов в качестве биомаркера антропогенных загрязнений водоемов [18].

При проведении работ по оценке активности механизма MXR наиболее часто применяются сложные иммунохимические методы – блоттинг с антителами на белки, родственные гликопротеинам, или электрофорез нативных белков [6; 7; 18]. Другое направление исследований включает флуорометрические методы с использованием красителей, обладающих флуоресцентной активностью. Так, при изучении функциональной активности механизма MXR широко применяют родамин С (родамин синий, rhodamine B) [16]. Родамин С имеет флуоресцентную активность и является субстратом АВС-транспортёров, в частности Р-гликопротеина. При проникновении во внутреннюю среду организма родамин С индуцирует выводящую активность белков-переносчиков, в результате чего препарат выводится из клеток, а затем и из организма [16]. По характеру выведения родамина С оценивают активность механизма множественной резистентности к ксенобиотикам у того или иного вида [16].

Флуорометрические методы оценки активности механизма множественной резистентности с использованием родамина С нашли широкое применение в медицинских исследованиях [5; 10]. Напротив, в экотоксикологических работах использование данных методов ограничивалось морскими организмами, из пресноводных видов исследованы лишь моллюски [6; 15; 16]. По нашему мнению, среди пресноводных организмов наиболее перспективным объектом подобных работ являются ракообразные, которые населяют практически все виды водных экосистем и могут быть успешно использованы в качестве тест-объектов для экотоксикологической оценки. Среди ракообразных наиболее подходящей для этих целей группой являются амфиподы (Amphipoda, Crustacea). Амфиподы – типичные обитатели большого количества континентальных водоемов, успешно содержатся в лабораторных условиях, а также обладают достаточно крупными размерами, что позволяет использовать в лабораторных экспериментах строго ограниченное количество особей.

Цель настоящей работы состояла в проверке возможности применения методики оценки накопления/выведения родамина С для определения активности механизма множественной резистентности к ксенобиотикам у пресноводных амфипод.

Материалы и методы

В качестве объекта экспериментов в работе использовали пресноводных амфипод эндемичного вида *Eulimnogammarus cyaneus* (Dyb) из оз. Байкал. Это литоральный вид гаммарид, обитающий в зоне с достаточно широким диапазоном колебаний условий среды. Рачков отлавливали на урезе воды в районе пос. Большие Коты (Южный Байкал). Перед экспериментами амфипод выдерживали 2–3 дня в аэрируемых аквариумах с байкальской водой при температуре 6–8 °С (предварительная акклимация).

В работе применяли метод оценки активности механизма МХР по определению уровня накопления/выведения препарата родамина С, близкий к описанному в работе [15] с авторскими дополнениями. Рачков на 1–3 ч помещали в воду, содержащую родамин С в концентрации 1 моль/л. В ходе предварительной экспозиции (преэкспозиции) родамин С, обладая хорошей растворимостью в воде, накапливался в определенном количестве в тканях рачков. После преэкспозиции рачков вынимали из рас-

творя препарата и не менее 3 раз ополаскивали чистой водой. Далее часть преэкспонированных рачков фиксировали (тест 0 ч), остальных помещали в чистую воду (контрольная группа) или в условия токсического стресса. Токсический стресс индуцировали растворами CdCl_2 с концентрациями 0,05 и 0,005 мг/л. Эксперименты проводили в условиях, аналогичных условиям предварительной акклимации. Длительность экспериментов составляла 24 ч, в течение которых в определенные периоды времени (1, 2, 4, 6, 12 и 24 ч) из опыта забирали и фиксировали часть рачков. Фиксированных рачков в течение 24 ч высушивали при 30 °С, а затем гомогенизировали в бидистиллированной воде. Гомогенат центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3 мин (Eppendorf Minispin). В отобранном супернатанте определяли уровень содержания родамина С с помощью спектрофлуориметра Shimadzu RF-5000 при 590 нм.

В каждом эксперименте использовали не менее 30 рачков, отбирая на каждый тест по 5 особей. Все эксперименты проведены не менее, чем в трех повторностях.

Все полученные данные обработаны статистически с использованием пакета программ Statistica 5.0. На графиках представлены средние и доверительные интервалы. Для сопоставления данных в ходе одного эксперимента использовали t-критерий Стьюдента при вероятности 95 % ($p = 0,05$).

Результаты и обсуждение

На рисунке представлена динамика содержания родамина С в тканях *E. cyaneus*. Как видно из графиков, в контрольной группе (рис., а) содержание родамина С начинает равномерно понижаться после помещения рачков в чистую воду. Уже через 4–6 часов уровень препарата снижается на 34 % и продолжает понижаться до окончания эксперимента (до 55 %), что свидетельствует в пользу активации механизма МХР.

В группе рачков, экспозиция которых проходила в растворах хлорида кадмия, отмечена иная картина выведения препарата. Так, у рачков, экспонированных в растворе с меньшей концентрацией хлорида кадмия (0,005 мг/л) (рис., б), скорость понижения уровня родамина С существенно замедлена. Через 4 ч экспозиции содержание родамина С составляло 89 %, а к концу эксперимента (24 ч) – 72 % от начального уровня содержания родамина С. В растворах с большей концентрацией хлорида кадмия (0,05 мг/л) в течение всего эксперимента дос-

товерного изменения уровня препарата отмечено не было (рис., в).

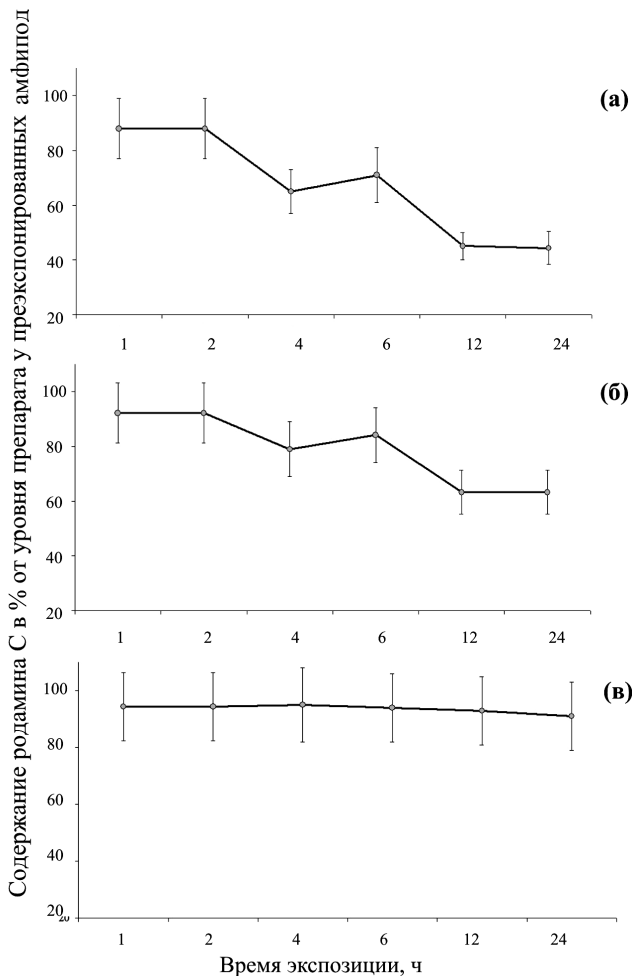


Рис. Содержание родамина С в тканях амфипод *E. suapeus* в течение 24-часовой экспозиции в контрольных условиях (а), в присутствии хлорида кадмия с концентрацией 0,005 мг/л (б) и 0,05 мг/л (в)

Таким образом, при воздействии токсиканта происходит снижение выведения родамина С. У амфипод, экспонированных 4 ч в растворах хлористого кадмия с концентрацией 0,005 мг/л, уровень препарата составляет 89 %, что в 1,35 раза превышает содержание родамина С у контрольной группы амфипод через 4 ч экспозиции, к концу эксперимента уровень родамина С у экспериментальной группы амфипод в 1,31 раз превышает таковой у контрольной группы.

Представленные материалы позволяют говорить о том, что у исследованных байкальских амфипод *E. suapeus* действует механизм множественной резистентности к ксенобиотикам. Предварительная экспозиция рачков в растворах родамина С, являющегося субстратом активности белков-переносчиков, ведет к

индукции активности неспецифической резистентности к ксенобиотикам. В результате препарат достаточно эффективно выводится из организма, что позволяет уже через 4–6 ч определить снижение его концентрации. Интоксикация рачков хлоридом кадмия ведет к снижению активности процесса выведения родамина С, при этом степень снижения зависит от дозы токсиканта. Влияние солей кадмия на активность MXR ранее было показано в работе [12], в которой исследовали влияние солей кадмия и цинка на активность MXR у моллюсков *Corbicula fluminea*, используя в качестве показателя изменения активности MXR содержание Р-гликопротеина. Было показано увеличение активности механизма множественной резистентности, однако наибольшее количество белка обнаружили у особей, подверженных воздействию растворов с наименьшей концентрацией токсиканта. Снижение активности механизма MXR у организмов при воздействии дизельного топлива также описано для мидий [17]. Материалы, полученные в нашем исследовании, также подтверждают возможность изменения активности MXR. Причины, лежащие в основе снижения эффективности выведения родамина С, могут заключаться как в непосредственном деструктивном воздействии на АВС-транспортёры, вызывающем сбой в реализации множественной резистентности, так и в повышении нагрузки на транспортные белки, что связано с дополнительной необходимостью выведения токсических компонентов из клетки. Также описаны случаи, когда воздействия ряда субстратов (даже нетоксичных) вызывали ингибирование Р-гликопротеина [8; 13].

Предлагаемая нами методика определения активности механизма множественной резистентности к ксенобиотикам несколько отличается от общепринятых. Так, в подавляющем большинстве работ активность механизма множественной резистентности определяют измерением выведенного родамина С в воде, в которой содержатся исследуемые организмы, либо оценкой накопления препарата в присутствии ингибиторов Р-гликопротеина [6; 13; 15; 17], либо с использованием иммунохимических методов [3; 4; 11; 14]. Мы предлагаем оценивать активность механизма MXR путем измерения содержания родамина С в тканях организмов, что, на наш взгляд, является более точным способом, так как в воде препарат может содержаться в малых количествах, что может повлечь за собой ошибку при анализе.

Таким образом, приведенный метод определения активности механизма множественной резистентности по интенсивности выведения родамина С прост и показателен, и может успешно применяться в экотоксикологических работах для выявления интоксикации организмов солями кадмия. В то же время указанный метод не позволяет точно выявить биохимические механизмы снижения активности MXR. Для более детальной оценки необходимо дополнительное применение иммунохимических и молекулярно-биологических подходов, позволяющих сопоставить не только активность, но количественную экспрессию транспортных белков.

Исследование проведено при частичной поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг., Аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы», проект № 2.1.1/982, грантов РФФИ № 08-04-00928-а, 10-04-00611-а, 10-04-92505-ИК-а, а также гранта Президента РФ МК-351.2009.4.

Литература

1. Ставровская А. А. Клеточные механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток / А. А. Ставровская // Биохимия. – 2000. – № 65. – С. 112–126.
2. Ставровская А. А. Опухолевая клетка в обороне / А. А. Ставровская // Сорос. образоват. журн. – 2001. – № 7. – С. 17–23.
3. Bioaccumulation of pollutants and measures of biomarkers in the Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) from downstream river Seine / A. Jaouen [et al.] // Bulletin de la Societe Zoologique de France. – 2000. – Vol. 125, N 3. – P. 239–249.
4. Clonal xenobiotic resistance during pollution-induced toxic injury and hepatocellular carcinogenesis in liver of female flounder (*Platichthys flesus* (L.)) / A. Koehler [et al.] // Acta Histochem. – 2004. – Vol. 106, N 2. – P. 155–170.
5. Effect of cycloartanes on reversal of multi-drug resistance and apoptosis induction on mouse lymphoma cells / A. Madureira [et al.] // Anticancer Res. – 2004. – Vol. 24, N 2B. – P. 859–864.
6. Eufemia N. The multixenobiotic defense mechanism in mussels is induced by substrates and non-substrates: implications for a general stress response / N. Eufemia, D. Epel // Mar. Environ. Res. – 1998. – Vol. 46, N 1. – P. 401–405.
7. Eufemia N. Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), p-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses / N. Eufemia, D. Epel // Aquat. Toxicol. – 2000. – Vol. 49, N 1. – P. 89–100.
8. Fragility of multixenobiotic resistance in aquatic organisms enhances the complexity of risk assessment / B. Kurelec [et al.] // Marine Environmental Research. – 1998. – Vol. 46, N 1–5. – P. 415–419.
9. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance / T. Litman [et al.] // Cell. Mol. Life Sci. – 2001. – Vol. 58, N 7. – P. 931–959.
10. Impact of BCRP/MXR, MRP1 and MDR1/P-Glycoprotein on thermoresistant variants of atypical and classical multidrug resistant cancer cells / U. Stein [et al.] // Intern. J. Cancer. – 2002. – Vol. 97, N 6. – P. 751–760.
11. Impact of cadmium contamination and oxygenation levels on biochemical responses in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* / A. Legeay [et al.] // Aquat. Toxicol. – 2005. – Vol. 74, N 3. – P. 242–253.
12. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure / M. Achard [et al.] // Aquat. Toxicol. – 2004. – Vol. 67, N 4. – P. 347–357.
13. Kurelec B. Determination of pollutants with multixenobiotic resistance inhibiting properties / B. Kurelec, B. Pivcevic, W. E. G. Muller // Marine Environmental Research. – 1995. – Vol. 39, N 1–4. – P. 261–265.
14. Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis* / C. Minier [et al.] // Aquatic Toxicol. – 2000. – Vol. 50. – P. 167–176.
15. Smital T. The activity of multixenobiotic resistance mechanism determined by Rhodamine B-efflux method as a biomarker of exposure / T. Smital, B. Kurelec // Mar. Environ. Res. – 1998. – Vol. 46, N 1. – P. 443–447.
16. Smital T. Measurement of the activity of multixenobiotic resistance mechanism in the common carp *Cyprinus carpio* / T. Smital, R. Sauerborn // Mar. Environ. Res. – 2002. – Vol. 54, N 3. – P. 449–453.
17. Smital T. Inducibility of the P-glycoprotein transport activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* and the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* / T. Smital, R. Sauerborn, B. Hackenberger // Aquat. Toxicol. – 2003. – Vol. 65, N 4. – P. 443–465.
18. The multixenobiotic resistance mechanism in the marine sponge *Suberites domuncula*: its potential applicability for the evaluation of environmental pollution by toxic compounds / W. Muller [et al.] // Mar. Biol. – 1996. – Vol. 125, N 1. – P. 165–170.

Evaluation of MXR activity in freshwater amphipod detected by intensity of rhodamine B efflux

M. A. Timofeyev, Zh. M. Shatilina,
V. V. Pavlichenko, D. S. Bedulina, M. V. Protopopova,
D. V. Axenov-Gribanov, E. A. Sapozhnikova

Baikal Research Center, Research Institute for Biology, Irkutsk State University, Irkutsk

Annotation. The aim of present study was an evaluation of possibility to use fluorometric method for multixenobiotic resistance mechanism's (MXR) activity detection in Baikalian organisms. *Eulimnogammarus cyaneus* (Dyb.), an endemic amphipods species, was used. MXR activity in control condition and by cadmium chloride exposure was evaluated. It was shown, that activation of MXR was induced by fluorometric substance in studied amphipods. Exposure of amphipods to cadmium chloride led to inhibit of MXR activity. It was concluded that described method of evaluation of MXR activity can be used for ecotoxicological studies.

Key words: multixenobiotic resistance mechanism's (MXR), amphipods, Baikal, cadmium chloride, rhodamine B.

Тимофеев Максим Анатольевич
Научно-исследовательский институт биологии
при ИГУ
664003, г. Иркутск, ул. Ленина, 3, а/я 24
кандидат биологических наук,
заведующий лабораторией
тел. (3952) 60-08-93
E-mail: m.a.timofeyev@gmail.com

Timofeyev Maxim Anatolyevitch
Irkutsk State University
Research Institute for Biology
3 Lenin St., Irkutsk, 664003
Ph. D. of Biology,
Head of Laboratory
phone: (3952) 60-08-93
E-mail: m.a.timofeyev@gmail.com

Шатилина Жанна Михайловна
Научно-исследовательский институт биологии
при ИГУ
664003, г. Иркутск, ул. Ленина, 3, а/я 24
кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник
тел. (3952) 60-08-93
E-mail: zhshatilina@gmail.com

Shatilina Zhanna Mikhailovna
Irkutsk State University
Research Institute for Biology
3 Lenin St., Irkutsk, 664003
Ph. D. of Biology,
leading research scientist
phone: (3952) 60-08-93
E-mail: zhshatilina@gmail.com

Павличенко Василий Валерьевич
Иркутский государственный университет
664003 г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5
аспирант
тел. (факс) (395 2) 24-18-55
E-mail: vpavlichenko@gmail.com

Pavlichenko Vasiliy Valeryevitch
Irkutsk State University
5 Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664003
doctoral student
phone (fax): (3952) 24-18-55
E-mail: vpavlichenko@gmail.com

Бедулина Дарья Сергеевна
Научно-исследовательский институт биологии при
ИГУ
664003, г. Иркутск, ул. Ленина, 3, а/я 24
кандидат биологических наук,
младший научный сотрудник
тел. (3952) 60-08-93
E-mail: daria.bedulina@gmail.com

Bedulina Darya Sergeevna
Irkutsk State University
Research Institute for Biology
3 Lenin St., Irkutsk, 664003
Ph. D. of Biology,
junior research scientist
phone: (3952) 60-08-93
E-mail: daria.bedulina@gmail.com

*Протопопова Марина Владимировна
Иркутский государственный университет
664003 г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5
аспирант
тел. (факс) (395 2) 24-18-55
E-mail: marina.v.protopopova@gmail.com*

*Protopopova Marina Vladimirovna
Irkutsk State University
5 Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664003
doctoral student
phone (fax): (3952) 24-18-55
E-mail: marina.v.protopopova@gmail.com*

*Аксёнов-Грибанов Денис Викторович
Иркутский государственный университет
664003 г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5
студент
тел. (факс) (395 2) 24-18-55
E-mail: denis.axengri@gmail.com*

*Axenov-Gribanov Denis Victorovitch
Irkutsk State University
5 Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664003
student
phone (fax): (3952) 24-18-55
E-mail: denis.axengri@gmail.com*

*Сапожникова Елена Александровна
Научно-исследовательский институт биологии при
ИГУ
664003, г. Иркутск, ул. Ленина, 3, а/я 24
младший научный сотрудник
тел. (3952) 60-08-93
E-mail: sapozhnikova.elena@gmail.com*

*Sapozhnikova Elena Alexandrovna
Irkutsk State University
Research Institute for Biology
3 Lenin St., Irkutsk, 664003
junior research scientist
phone: (3952) 60-08-93
E-mail: daria.bedulina@gmail.com*